

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/68, C07H 21/04, C12P 19/34, A61K 31/70		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/24686 (43) Date de publication internationale: 15 août 1996 (15.08.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00202 (22) Date de dépôt international: 7 février 1996 (07.02.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/01431 8 février 1995 (08.02.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy l'Etoile (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MABILAT, Claude [FR/FR]; 408, chemin Pierre-Drevet, F-69140 Rilleux-la- Pape (FR). SALLEN, Brunehild [FR/FR]; 14, rue Jacques- Monod, F-69007 Lyon (FR). (74) Mandataire: TONNELIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).			(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
(54) Title: DETECTION OF BACTERIA OF GENUS LISTERIA USING NUCLEIC PROBE HYBRIDISATION TECHNIQUES (54) Titre: DETECTION DE BACTERIES DU GENRE LISTERIA SELON DES TECHNIQUES D'HYBRIDATION DE SONDAS NUCLEIQUES (57) Abstract Single-stranded oligonucleotides capable of hybridising with the ribosomal RNA 23S of bacteria of genus <i>Listeria</i> , or with one of the strands of the corresponding DNA, are disclosed. The oligonucleotides are particularly useful as probes specific for genus <i>Listeria</i> , or for a species or group of species thereof, as applicable, in detection methods using nucleic probe hybridisation techniques. (57) Abrégé Oligonucléotides monocaténares capables de s'hybrider avec l'ARN ribosomique 23S de bactéries du genre <i>Listeria</i> , ou avec l'un des brins de l'ADN correspondant. Ces oligonucléotides sont utilisables notamment comme sondes spécifiques, selon les cas, du genre <i>Listeria</i> , ou d'une espèce ou d'un groupe d'espèces dudit genre, dans des méthodes de détection utilisant les techniques d'hybridation de sondes nucléiques.			

Best Available Copy

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Détection de bactéries du genre *Listeria* selon des techniques d'hybridation de sondes nucléiques.

La présente invention concerne le domaine des techniques de détection et/ou
5 d'amplification, à l'aide de sondes ou d'amorces oligonucléotidiques, et leur application à la recherche de la présence ou à l'identification de bactéries du genre *Listeria*.

Les *Listeria* sont des bactéries Gram + appartenant à la famille des Listeriaceae, qui est subdivisée en deux genres : le genre *Listeria* et le genre *Brochothrix* (Collins et al., 1991, International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 240-246). Le genre *Listeria*
10 regroupe les espèces bactériennes suivantes : *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria murrayi* et *Listeria grayi*. Seule l'espèce *Listeria monocytogenes* présente un pouvoir pathogène pour l'homme. Cette espèce est notamment responsable chez l'homme de pathologies sévères telles que des méningo-encéphalites, septicémies ou avortements. Par ailleurs, depuis 1981, l'espèce *Listeria*
15 *monocytogenes* est reconnue comme agent responsable de plusieurs épidémies d'intoxications alimentaires, notamment au Canada en 1981, aux Etats Unis de 1983 à 1985, en Suisse de 1983 à 1987 et très récemment en France en 1992 et 1993. Le taux de mortalité associé à ces épidémies est très élevé, un tiers environ des cas aboutissant à un avortement ou à un décès.

Il est donc important de développer un test de diagnostic bactériologique
20 suffisamment spécifique et sensible pour permettre une détection rapide et sélective de l'espèce *Listeria monocytogenes*, utilisable notamment dans l'industrie alimentaire et le diagnostic médical.

Une première génération de tests rapides a été proposée, basés sur la technique de cytométrie de flux (Donnelly C.W., G.J. Baigent, and E.H. Briggs, 1988 : Flow cytometry for
25 automated analysis of milk containing *Listeria monocytogenes* ; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71: 655-658) ou sur la méthode ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") (Mattingley J.A., B.T. Butman, M.C. Planck, R.J. Durham, and B.J. Robinson, 1988 : Rapid monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Listeria* in food products ; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71: 679-681). Toutefois, ces techniques ne permettent
30 que la détection des bactéries appartenant au genre *Listeria* sans aucune discrimination des espèces, et notamment de l'espèce pathogène *Listeria monocytogenes*.

D'autres techniques de détection par hybridation d'acides nucléiques, utilisant des marqueurs génétiques, ont ensuite été développées. Il a ainsi été montré que certaines séquences d'acides nucléiques sont spécifiques de la seule espèce *L. monocytogenes*. Ces séquences font notamment partie des gènes codant pour des déterminants de virulence, tels que la région en aval du gène *hlyA* (listeriolysine O) (Mengaud J., M.F. Vicente, J. Chenevert, J. Moniz-Pereira, C. Geoffroy, B. Gicquel-Sanzey, F. Baquero, J.C. Perez-Diaz, and P. Cossart, 1988 : Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes* ; Infect. Immun. 56: 766-772) ou le gène *iap* ("invasion-associated protein", encore appelée p60, Köhler S., M. Leimeister-Wächter, T. Chakraborty, F. Lottspeich, and W. Goebel, 1990 : The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes* ; Infect. Immun. 58: 1943-1950). Toutefois, l'utilisation de ces marqueurs nécessite une étape préalable d'amplification d'acide nucléique afin d'obtenir une sensibilité convenable des tests, car chacun de ces gènes n'est présent qu'en monocopie.

La présente invention pallie les inconvénients précédemment cités pour la mise en évidence de la présence de bactéries du genre *Listeria*, et plus particulièrement de l'espèce *Listeria monocytogenes*, par utilisation d'un marqueur génétique dans un procédé de détection par hybridation d'acides nucléiques, alliant spécificité, sensibilité et rapidité.

Les ribosomes bactériens contiennent au moins trois molécules d'ARN distinctes appelées ARNr 5S, 16S et 23S. Historiquement, ces dénominations ont été choisies par référence à leur vitesse de sédimentation, qui est reliée à la taille de ces molécules d'ARN.

Dans le procédé de l'invention, l'ARN ribosomique (ARNr) des bactéries peut être utilisé comme cible. Un des avantages de cette utilisation est que l'ARNr est retrouvé en abondance dans toutes les cellules des organismes vivants.

L'utilisation de l'ARNr 16S de *Listeria* dans le diagnostic des listerioses a été décrite (voir notamment Wang R.-F. et al., 1991 : Development of a 16S rRNA-based oligomer probe specific for *Listeria monocytogenes* ; Appl. Environ. Microbiol. 57:3666-3670, les demandes de brevet n° EP 314 294, n° WO 90/0884 et le brevet des Etats Unis n° US 5 089 386).

On a maintenant découvert sur l'ADN codant pour l'ARN ribosomique de la sous-unité 23S des zones variables selon les genres bactériens, mais qui apparaissent conservées parmi les espèces appartenant au genre des *Listeria*, ce qui permet de discriminer au moins un groupe d'espèces du genre *Listeria* d'autres genres ou groupes de genres bactériens. Par ailleurs, il

existe dans lesdites zones conservées parmi les espèces du genre *Listeria*, des variations mineures de séquence entre lesdites espèces. Ces différents résultats ont permis de concevoir des sondes nucléiques spécifiques d'espèces ou de groupes d'espèces de *Listeria*.

Avant d'exposer plus en détail l'invention, différents termes utilisés dans la description et les revendications sont définis ci-après :

- par "acide nucléique extrait de bactéries" on entend soit l'acide nucléique total, soit l'ARN ribosomique, en particulier l'ARNr 23S, soit l'ADN génomique, soit encore l'ADN obtenu à partir de la transcription inverse de l'ARN ribosomique 23S ;

- un "fragment nucléotidique" ou un "oligonucléotide" sont deux termes synonymes désignant un enchaînement de motifs nucléotidiques caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels (ou éventuellement modifiés) et susceptibles de s'hybrider, comme les acides nucléiques naturels, avec un fragment nucléotidique complémentaire ou sensiblement complémentaire, dans des conditions prédéterminées.

L'enchaînement peut contenir des motifs nucléotidiques de structure différente de celle des acides nucléiques naturels. Un fragment nucléotidique (ou oligonucléotide) peut contenir par exemple jusqu'à 100 motifs nucléotidiques. Il contient généralement au moins 10, et en particulier au moins 12 motifs nucléotidiques et peut être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,

- un motif nucléotidique est dérivé d'un monomère qui peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée ; dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose, dans l'ARN le sucre est le ribose ; selon qu'il s'agit d'ADN ou d'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, avec des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-déoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre, par exemple le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991)), soit encore au niveau du groupement phosphate, par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les diphosphates, alkyl- et aryl-phosphonates et phosphorothioates,

- par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de motifs de type nucléotidique, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence constituent une information analogue à celle donnée par la séquence des acides nucléiques naturels,

- par "hybridation", on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques ayant des séquences suffisamment complémentaires sont susceptibles de s'associer par des liaisons hydrogène stables et spécifiques, pour former un double brin. Les conditions d'hybridation sont déterminées par la "stringence", c'est-à-dire la rigueur des conditions opératoires. L'hybridation est d'autant plus spécifique qu'elle est effectuée à plus forte stringence. La stringence est fonction notamment de la composition en bases d'un duplex sonde/cible, ainsi que par le degré de mésappariement entre deux acides nucléiques. La stringence peut également être fonction des paramètres de la réaction d'hybridation, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. La stringence des conditions dans lesquelles une réaction d'hybridation doit être réalisée dépend notamment des sondes utilisées. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent éventuellement être déterminées dans chaque cas par des expériences de routine. En général, selon la longueur des sondes utilisées, la température pour la réaction d'hybridation est comprise entre environ 20 et 65°C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,8 à 1M.
- une "sonde" est un fragment nucléotidique comprenant par exemple de 10 à 100 motifs nucléotidiques, notamment de 12 à 35 motifs nucléotidiques, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un acide nucléique cible ayant, dans le cas présent, une séquence nucléotidique comprise soit dans un ARN ribosomique, soit dans un ADN obtenu par transcription inverse dudit ARN ribosomique, soit encore dans un ADN (appelé ici ADN ribosomique ou ADN_r) dont ledit ARN ribosomique est le produit de transcription ; une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic (notamment sondes de capture ou de détection) ou à des fins de thérapie,
- une "sonde de capture" est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, par exemple par covalence, par adsorption, ou par synthèse directe sur un support solide (voir notamment la demande de brevet WO 92 10092)

- une "sonde de détection" peut être marquée au moyen d'un marqueur choisi par exemple parmi les isotopes radioactifs, des enzymes, en particulier des enzymes susceptibles d'agir sur un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent (notamment une peroxydase ou une phosphatase alcaline), des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et des ligands tels que la biotine,

- une "amorce" est une sonde comprenant par exemple de 10 à 100 motifs nucléotidiques et possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique, par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé de séquençage, dans une méthode de transcription inverse, etc..

Les sondes selon l'invention peuvent être utilisées, à des fins de diagnostic, dans la recherche de la présence ou de l'absence d'un acide nucléique cible dans un échantillon, selon toutes les techniques d'hybridation connues et notamment les techniques de dépôt ponctuel sur filtre, dites "dot-blot" (MANIATIS et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982), les techniques de transfert d'ADN dites "Southern blot" (SOUTHERN. E.M., J. Mol. Biol., 98, 503 (1975), les techniques de transfert d'ARN dites "Northern blot", ou les techniques dites "sandwich" (DUNN A.R., HASSEL J.A., Cell, 12, 23 (1977)) ; on utilise en particulier la technique sandwich, avec une sonde de capture et/ou une sonde de détection, lesdites sondes étant capables de s'hybrider avec deux régions différentes de l'acide nucléique cible, et l'une au moins desdites sondes (généralement la sonde de détection) étant capable de s'hybrider avec une région de la cible qui est spécifique de l'espèce ou du groupe d'espèces recherché, étant entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent avoir des séquences nucléotidiques au moins partiellement différentes.

Dans des conditions qui sont précisées dans l'exemple 1 ci-après, on a déterminé la séquence nucléotidique de l'ADNr correspondant à l'ARN ribosomique 23S de deux espèces de *Listeria*, ainsi que d'une espèce du genre phylogénique immédiatement voisin de celui des *Listeria*, à savoir le genre *Brochothrix*. Cette étude a porté sur les espèces *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *Brochothrix thermosphacta*.

On a recherché des régions fortement conservées pour le seul genre *Listeria*, permettant de le distinguer des autres genres bactériens, ainsi que des régions variables au sein du genre *Listeria*, et qui permettent donc de distinguer plusieurs espèces ou groupes d'espèces de

Listeria. On a ainsi sélectionné, en faisant référence à la numérotation de la séquence nucléotidique de l'ARNr 23S de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, trois régions intéressantes, à savoir 664-728, 1188-1251 et 2209-2275. On a déterminé les séquences de ces mêmes régions pour différentes souches des autres espèces de *Listeria* ainsi que pour l'espèce

5 *Brochothrix campestris*. Les résultats de ces différents séquençages sont résumés dans le tableau de séquences présenté en Annexe. Dans les séquences de ce tableau, le signe * représente un site vacant dont la représentation est nécessaire pour l'alignement des séquences en tenant compte de certaines espèces possédant à ce site un motif nucléotidique supplémentaire.

10 Les résultats de ces recherches, c'est-à-dire les alignements de séquences figurant dans le tableau en Annexe, ont permis de concevoir des sondes permettant de détecter des groupes d'espèces ou d'identifier certaines espèces du genre *Listeria*. En choisissant des sondes dans les régions conservées chez toutes les espèces de *Listeria*, on peut détecter la présence ou l'absence d'au moins une bactérie quelconque du genre *Listeria*. En utilisant des sondes

15 contenant des zones mutées pour une espèce particulière (par rapport à l'espèce de référence, ici *L. monocytogenes*), il est possible de détecter directement la présence d'une telle espèce. Dans les techniques d'hybridation sandwich, utilisant deux sondes en combinaison (sonde de capture et sonde de détection), on utilisera par exemple en combinaison une sonde spécifique du genre *Listeria* et une sonde spécifique de l'espèce considérée. On peut aussi utiliser en

20 combinaison deux sondes spécifiques de ladite espèce, lorsqu'elles existent, ces deux sondes étant complémentaires de régions non chevauchantes de l'ARNr 23S de ladite espèce.

Dans d'autres cas (notamment pour *Listeria monocytogenes*), il n'existe pas de sonde unique permettant de caractériser directement une espèce donnée. Il est alors possible d'utiliser en combinaison deux sondes, (notamment selon la technique d'hybridation sandwich), à savoir,

25 par exemple : d'une part, une première sonde permettant l'hybridation avec l'ARNr (ou l'ADNr) de *Listeria monocytogenes* et d'une seconde espèce de *Listeria*, et d'autre part, une deuxième sonde capable de s'hybrider avec l'ARNr ou l'ADNr de *Listeria monocytogenes* et d'une ou plusieurs autres espèces de *Listeria* mais pas de ladite seconde espèce. Si on observe une hybridation de l'acide nucléique de l'échantillon avec un tel système de deux sondes, on peut

30 conclure à la présence de *Listeria monocytogenes*.

Comme on l'a indiqué précédemment, les sondes nucléotidiques de l'invention peuvent être utilisées dans les méthodes classiques d'hybridation. L'acide nucléique à détecter (cible)

peut être de l'ADN (éventuellement obtenu après amplification) ou de l'ARN. Dans le cas d'une cible nucléique double brin, il convient de procéder à sa dénaturation avant la mise en oeuvre du procédé de détection. L'acide nucléique cible peut être obtenu par extraction selon les méthodes connues des acides nucléiques d'un échantillon à examiner. La dénaturation d'un
5 acide nucléique double brin peut être effectuée par les méthodes connues de dénaturation chimique, physique ou enzymatique, et en particulier par chauffage à une température appropriée, supérieure à 80°C.

Dans certains cas, la mise en évidence de la présence d'une espèce de *Listeria* donnée nécessite l'utilisation de sondes permettant la détection d'une mutation ponctuelle. Pour cela, il
10 convient d'opérer avec des sondes d'une longueur (nombre de motifs nucléotidique) prédéterminée, dans des conditions elles-mêmes prédéterminées. D'autres précisions sont données ci-après, en faisant référence plus particulièrement à la méthode d'hybridation sandwich qui constitue l'une des méthodes d'hybridation les plus pratiques actuellement. Cette méthode comprend la mise en contact d'une première sonde fixée sur un support solide avec
15 une solution contenant l'acide nucléique à analyser, et la mise en contact dudit support avec la sonde de détection, l'incubation du mélange obtenu, le rinçage du support, pour éliminer les constituants non fixés sur le support par hybridation spécifique, et la détection qualitative ou quantitative, à l'aide d'une réaction de révélation du marqueur fixé sur le support, de la sonde de détection fixée. La révélation de la présence du marqueur peut être effectuée par exemple
20 par colorimétrie, fluorescence ou luminescence. La mise en contact de la sonde de capture avec l'échantillon et avec la sonde de détection peut être effectuée de façon séquentielle, éventuellement avec rinçage intermédiaire du support. On peut également opérer par mise en contact simultanée ou quasi-simultanée de la sonde de capture fixée sur le support avec une solution contenant l'échantillon et la sonde de détection qui peuvent être ajoutées sous forme
25 de mélange ou séparément.

Les stades d'incubation et de lavage consécutif, qui constituent les étapes-clés du procédé d'hybridation sandwich, sont chacune effectuée à une température constante qui peut être par exemple comprise dans la gamme mentionnée plus haut (voir les "Définitions"). On sait que les hybrides d'acides nucléiques ont une température de dissociation qui dépend du
30 nombre de bases hybridées (la température augmentant avec la taille de l'hybride) et qui dépend également de la nature des bases hybridées et, pour chaque base hybridée, de la nature des bases adjacentes. La dissociation des hybrides se produit sur un intervalle de température de

quelques degrés et peut être facilement déterminée, par exemple en spectroscopie U.V.. Il est possible de déterminer expérimentalement la température de demi-dissociation de l'hybride formé par une sonde donnée avec la cible de séquence complémentaire, par de simples expériences de routine. La température d'hybridation utilisée dans la technique d'hybridation sandwich doit évidemment être choisie en-dessous de la température de demi-dissociation. Plus exactement, on opère à une température inférieure à la température de demi-dissociation de l'hybride le moins stable parmi les deux hybrides que forme la cible avec d'une part la sonde de capture et d'autre part la sonde de détection, afin que les deux hybrides soient stables à la température à laquelle on opère. Une mutation ponctuelle, c'est-à-dire une mutation entraînant un mésappariement portant sur une seule paire de bases dans l'hybride, entraîne une modification, généralement un abaissement, de la température de demi-dissociation. En utilisant des sondes suffisamment courtes, un tel mésappariement unique peut entraîner un abaissement relativement important de la température de demi-dissociation, de l'ordre de quelques degrés. Ainsi, en choisissant, à l'aide d'expériences de routine préalables, une sonde de longueur appropriée, en opérant dans une solution tampon donnée, il est possible de déterminer une température à laquelle il sera possible de n'observer l'hybridation que dans le cas où la sonde est strictement complémentaire de la cible. En outre, grâce au choix de sondes courtes de longueur prédéterminée, il est possible de mettre en oeuvre la technique d'hybridation sandwich à une température unique prédéterminée, par exemple 37°C. Pour une discussion plus détaillée de la technique d'hybridation sandwich avec utilisation de sondes courtes, on peut se reporter notamment à la demande de brevet FR-2.663.040.

L'invention a donc pour objet un oligonucléotique monocaténaire, caractérisé par le fait qu'il est choisi parmi les oligonucléotides, ayant au moins 12 motifs nucléotidiques, dont la séquence est incluse dans l'une des séquences (a₁) à (a₁₀) de la liste suivante :

- 25 (a₁) GGAGCCGTAG CGAAAGCGAG TCTGAATAGG GCGCATAAGT AACAGGTCGT
AGACCCGAAA CCAGG
- (a₂) GGAGCCGTAG CGAAAGCGAG TCTGAATAGG GCGAATAAGT AACAGGTCGT
AGACCCGAAA CCAGG
- (a₃) GGAGCCGTAG CGAAAGCGAG TCTGAATAGG GCGTATGAAG TAACAGGTCTG
30 TAGACCCGAA ACCAGG
- (a₄) CCGAAACTGT GGATGAACCT CTTTAGAGGT TCGTGGTAGG AGAGCGTTCT
AAGG

- (a₅) AAACATATTA CCGAAACTGT GGATGAACCT CTTCGGAGGT TCGTGGTAGG
AGAGCGTTCT AAGG
- (a₆) AAACATATTA CCGAAACTGT GGATGAACCT CTTATAGAGG TTCGTGGTAG
GAGAGCGTTC TAAGG
- 5 (a₇) AAACGTATTA CCGAAACTGT GGATGAACAT CTTCGGATGT TCGTGGTAGG
AGAGCGTTCT AAGG
- (a₈) ACCCTGGCTG TATGACCATT CTAACCCGCC ACGCTTAGCG CGTGGGGAGA
CAGTGTCAGG TGGGCAG
- (a₉) ACCCTGGCTG TATGACCATT CTAACCCACC ACGCTTAGCG CGTGGGGAGA
10 CAGTGTCAGG TGGGCAG
- (a₁₀) ACCCTGGCTG TATGACCATT CTAACCCGCC ACGCTAAGCG CGTGGGGAGA
CAGTGTCAGG TGGGCAG ;

ainsi qu'un oligonucléotide complémentaire dudit oligonucléotide.

- Parmi les oligonucléotides de l'invention dont la séquence est incluse dans la séquence
15 (a₄), on citera en particulier ceux dont la séquence est incluse dans la séquence (a'₄) :

(a'₄) CCGAAACTGT GGATGAACCT CTTTAGAGGT TCGTGGTAGG

Parmi les oligonucléotides de l'invention, certains peuvent être utilisés pour caractériser une espèce ou un groupe d'espèces du genre *Listeria*. Ce sont notamment les oligonucléotides définis à l'aide des séquences (b₁) à (b₁₅) et (c₁) à (c₁₄) ci-après.

- 20 L'invention concerne en particulier un oligonucléotide tel que défini ci-dessus, caractérisé par le fait qu'il comporte une séquence d'au moins cinq motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans une séquence comprise à l'intérieur des crochets figurant dans les séquences (b₁) à (b₁₅) de la liste suivante :

	(b ₁)	AGTCTGAATA	GG [GCGCATA] A	GTAACAGGTC	GTAGA	
	(b ₂)	AGTCTGAATA	GG [GCGAATA] A	GTAACAGGTC	GTAGA	
	(b ₃)	AGTCTGAATA	GG [GCGTATGA	AG] TAACAGGT	CGTAGA	
	(b ₄)	CCGAAACTGT	GGATGAACCT	[CTTTAGAG] GT	TCGTGGTAGG	
5	(b ₅)	CCGAAACTGT	GGATGAACCT	[CTTCGGAG] GT	TCGTGGTAGG	
	(b ₆)	CCGAAACTGT	GGATGAACCT	[CTTATAG] AGG	TTCGTGGTAG	G
	(b ₇)	CCGAAACTGT	GGATGAACAT	CTT [CGGATGT	T] CGTGGTAGG	
	(b ₈)	A [AACGTAT] TA	CCGAAACTGT	GGATGAA		
	(b ₉)	CCGAAACTGT	GGATG [AACAT	CT] TCGGATGT	TCGTGGTAGG	
10	(b ₁₀)	TGGCTGTATG	ACCATTCTAA	[CCCGCCA] CGC	T	
	(b ₁₁)	CCAC [GCTTAG	C] GCGTGGGGA	GACAGTGTCA	GG	
	(b ₁₂)	TGGCTGTATG	ACCATTCTAA	[CCCACCA] CGC	TTAGCGCGTG	
		GGGAGACAGT	GTCAGG			
	(b ₁₃)	TGGCTGTATG	ACCATTCTAA	CCCGCCAC [GC	TAAGC] GCGTG	
15		GGGAGACAGT	GTCAGG			
	(b ₁₄)	[CCGCCA] CGCT	TAGCGCGTGG	GGAGACAGTG	TCAGGTGGGC	AG
	(b ₁₅)	TGGCTGTATG	ACCATTCTAA	CCCGCCAC [GC	TTAG] ;	

ainsi qu'un oligonucléotide complémentaire dudit oligonucléotide.

L'invention concerne notamment un oligonucléotide tel que défini précédemment,
 20 caractérisé par le fait que sa séquence est incluse dans l'une des séquences (c₁) à (c₁₄)
 suivantes :

	(c ₁)	GAATAGGGCG	CATAAGTAAC	A
	(c ₂)	GAATAGGGCG	AATAAGTAAC	A
	(c ₃)	ATAGGGCGTA	TGAAGTAACA	
25	(c ₄)	TGAACCTCTT	TAGAGGTTCG	TG
	(c ₅)	TGAACCTCTT	CGGAGGTTCG	TG
	(c ₆)	TGAACCTCTT	ATAGAGGTTC	G
	(c ₇)	GTGGATGAAC	ATCTTCGGAT	GTTCGTGGTA
	(c ₈)	AAACGTATTA	CCGAA	
30	(c ₉)	ATTCTAACCC	GCCACGCT	
	(c ₁₀)	ATTCTAACCC	ACCACGCTTA	G

(c₁₁) CCACGCTTAG CGCGTGG G
(c₁₂) CCGCCACGCT AAGCGCGTGG G
(c₁₃) CCGCCACGCT TAGCGCGTGG G
(c₁₄) TTCTAACCCG CCACGCTTAG ;

5 ainsi qu'un oligonucléotide complémentaire dudit nucléotide.

Parmi les oligonucléotides de l'invention, certains sont utilisables comme sonde permettant de détecter toute bactérie du genre *Listeria*. Ce sont notamment les oligonucléotides définis à l'aide des séquences (d₁) à (d₆) ci-après.

L'invention a donc également pour objet un oligonucléotide tel que défini précédemment,
10 caractérisé par le fait que sa séquence est incluse dans l'une des séquences (d₁) à (d₆) suivantes :

(d₁) AAGTAACAGG TCGTAGAC
(d₂) TATTACCGAA ACTGTGGATG AAC
(d₃) ACCCTGGCTG TATGACCATT CTAACCC
15 (d₄) AGCGCGTGGG GAGACAGT
(d₅) CAGTGTCAGG TGGGCAG
(d₆) GTTCGTGGTA GGAGAGCGTT.

Pour l'utilisation dans les techniques d'hybridation classiques, les oligonucléotides de l'invention peuvent être immobilisés sur un support solide (c'est notamment le cas d'une
20 sonde de capture) ou marqués avec un agent traceur (sonde de détection).

L'invention a également pour objet un procédé de détermination de la présence ou de l'absence d'au moins une bactérie du genre *Listeria*, dans un échantillon contenant ou susceptible de contenir des acides nucléiques d'au moins une telle bactérie, selon une méthode dans laquelle on met en contact ledit échantillon avec au moins une sonde nucléique, puis on
25 détermine de façon connue en soi la formation ou l'absence de formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon, caractérisé par le fait que ladite sonde est un oligonucléotide choisi parmi ceux qui ont été définis précédemment.

Pour la détermination de la présence ou de l'absence d'une espèce ou d'un groupe d'espèces de bactérie du genre *Listeria*, on peut utiliser comme sondes nucléiques d'une part
30 une première sonde telle que définie précédemment et d'autre part une sonde telle que définie par l'une des séquences (b₁) à (b₁₅) ou (c₁) à (c₁₄), étant entendu que lesdites première et

seconde sondes sont capables de s'hybrider avec des régions non chevauchantes de l'ARNr 23S (ou son complémentaire) d'une bactérie du genre *Listeria*. La première sonde est par exemple immobilisée sur un support solide et la seconde sonde est marquée avec un agent traceur. Pour déterminer la présence ou l'absence d'au moins une bactérie (quelconque) du genre *Listeria*, on peut utiliser comme sonde au moins un oligonucléotide tel que défini par les séquences (d₁) à (d₆).

On peut détecter la présence de certaines bactéries du genre *Listeria*, éventuellement avec une seule sonde, par exemple :

- *Listeria seeligeri* : sonde incluse dans la séquence (b₂), (b₁₂), (c₂) ou (c₁₀) ;
- *Listeria innocua* : sonde incluse dans la séquence (b₁₃) ou (c₁₂) ;
- *Listeria ivanovii* : sonde incluse dans la séquence (b₆) ou (c₆) ;
- *Listeria grayi* et/ou *Listeria murrayi* (ces deux espèces ne pouvant pas être distinguées à l'aide des sondes de l'invention) : sonde incluse dans la séquence (b₃), (b₇), (b₈), (b₉), (c₃), (c₇) ou (c₈).

Lorsqu'on souhaite utiliser une sonde qui dérive de l'Annexe 1/3, en vue de la détermination d'une espèce particulière, il convient de vérifier préalablement à l'aide des sondes (b₆) ou (c₆) si *Listeria ivanovii* est présente. Dans l'affirmative, on ne peut pas utiliser une sonde dérivée de l'Annexe 1/3 pour la détermination envisagée (car la séquence correspondant à l'Annexe 1/3 n'a pas été déterminée pour *L. ivanovii*).

Lorsqu'on utilise un système à deux sondes, on peut utiliser, pour déterminer les bactéries qui viennent d'être mentionnées, d'une part une sonde spécifique du genre *Listeria* (incluse dans l'une des séquences (d₁) à (d₆)) en combinaison avec les séquences spécifiques qui viennent d'être indiquées. Lorsqu'il existe plusieurs sondes spécifiques de l'espèce recherchée, on peut bien entendu utiliser la combinaison de deux telles sondes spécifiques de cette espèce.

Pour la détermination de la présence ou de l'absence de *Listeria monocytogenes*, on utilise un système à deux sondes, en particulier dans un procédé caractérisé par le fait :

- que l'une des sondes a une séquence incluse dans la séquence (b₁), (b₁₀), (b₁₄) ou (b₁₅) et l'autre sonde une séquence incluse dans la séquence (b₄),
- ou que l'une des sondes a une séquence incluse dans la séquence (c₁), (c₉), (c₁₃) ou (c₁₄) et l'autre incluse dans la séquence (c₄).

Les divers oligonucléotides qui ont été définis précédemment peuvent également être utilisés comme amorces nucléotidiques pour la synthèse d'un acide nucléique en présence d'une polymérase de façon connue en soi, et notamment dans des méthodes d'amplification utilisant une telle synthèse en présence d'une polymérase (PCR, RT-PCR, etc...).

- 5 On peut utiliser notamment les oligonucléotides de l'invention comme amorces pour la transcription inverse spécifique d'une séquence d'ARN ribosomique 23S d'au moins une espèce ou d'au moins un groupe d'espèces du genre *Listeria* pour obtenir une séquence d'ADN complémentaire correspondante. Une telle transcription inverse peut constituer le premier stade d'une RT-PCR, le stade suivant étant l'amplification par PCR de l'ADN complémentaire
- 10 obtenu. On peut également utiliser ces oligonucléotides comme amorces, notamment pour l'amplification spécifique par réaction de polymérisation en chaîne de la séquence d'ADNr complémentaire d'une séquence d'ARN ribosomique 23S d'au moins une espèce ou d'au moins un groupe d'espèces du genre *Listeria*. Les oligonucléotides définis précédemment peuvent être également utilisés comme sondes de thérapie pour traiter les infections provoquées par au
- 15 moins une espèce ou un groupe d'espèces de bactéries du genre *Listeria*. Ces sondes de thérapie, capables de s'hybrider sur l'ARN ribosomique 23S et/ou sur l'ADN génomique desdites bactéries peuvent bloquer les phénomènes de traduction et/ou de transcription et/ou de répllication. Le principe des méthodes de thérapie génique est connu et repose notamment sur l'utilisation d'une sonde correspondant à un brin anti-sens : la formation d'un hybride entre
- 20 la sonde et le brin sens est capable de perturber au moins l'une des étapes du décryptage de l'information génétique. La formation d'un duplex entre un oligonucléotide selon l'invention et l'ARN ribosomique 23S des bactéries-cibles est également susceptible de perturber la configuration spatiale dudit ARNr et/ou l'association dudit ARNr avec les protéines constitutives du ribosome. Les sondes de thérapie sont donc utilisables comme médicaments
- 25 antibactériens, permettant de lutter contre les infections causées par des *Listeria*, y compris *Listeria monocytogenes*.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

EXEMPLE 1 : Détermination de la séquence nucléotidique des ARN ribosomique 23S de *Listeria*

La séquence nucléotidique de l'ADN correspondant à l'ARN ribosomique de la sous-unité 23S pour les espèces suivantes a été déterminée :

5	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19115
	<i>L. innocua</i>	ATCC 33090
	<i>L. seeligeri</i>	CCUG 15330
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	ATCC 11509

Le séquençage a été réalisé selon les étapes suivantes : extraction de l'ADN des
10 souches par la méthode de Sjöbring et al. (1990. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 28 (10):2200-2204), amplification par PCR de l'ADN ribosomique 23S à l'aide d'amorces eubactériennes définies dans les zones phylogéniquement conservées de ce type d'ARN. Les couples de sondes eubactériennes utilisés, correspondant à des séquences communes à toutes les bactéries, étaient les suivants :

15	a)	5'	TCCGAATGGG	GAAACCC	3'	positions 115-130
		5'	GATCTGGGCT	GTTTC	3'	positions 988-1002
	b)	5'	AAGAGGGAAA	CARCCCAGA	3'	positions 982-1000
		5'	GGAACCTACC	CGACAAGG	3'	positions 1963-1982
	c)	5'	GAAATTCCTT	GTCGGGT	3'	positions 1957-1975
20		5'	CTAGGTCTGA	CCTATCAAT	3'	positions 2864-2882

On rappelle que R signifie : G ou A.

Cette étape a permis l'amplification de 3 zones d'environ 1kb permettant de couvrir l'ensemble de la cible 23S et qui ont été séquencées sur chacun des 2 brins par la méthode de terminaison de chaîne sur un séquenceur Applied Biosystems ABI 360 (Sanger et al., Proc.
25 Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74: 5463-5467).

On a ensuite sélectionné trois régions correspondant aux séquences nucléotidiques 664-728, 1188-1251 et 2209-2275 (référence à *L. monocytogenes* ATCC 19115 ; voir Annexes 1/3 à 3/3).

L'ARN 23S de ces régions a été séquencé pour diverses espèces et souches de
30 *Listeria* et de *Brochothrix*. Les résultats sont rassemblés dans le tableau de séquences figurant en Annexe.

EXEMPLE 2 : Utilisation de sondes dirigées contre l'ARN ribosomique 23S du genre *Listeria* pour l'identification spécifique de *Listeria monocytogenes*

On a préparé la sonde suivante (complémentaire d'une séquence de la page 2/3 de l'Annexe) :

ACGAACCTCT AAAGAG

Cette sonde a été utilisée comme sonde de détection dans un test d'hybridation sandwich.

Une autre sonde (complémentaire d'une séquence de la page 3/3 de l'Annexe) a été préparée :

TAAGCGTGGC GGGTTAGAAT,

et a été utilisée comme sonde de capture dans ce test.

L'ARNr 23S d'une collection de souches de *Listeria* et d'autres espèces bactériennes (voir ci-dessous) a été testée par hybridation à l'aide de ces deux sondes :

- 23 souches de *L. monocytogenes*, de sérovars et de provenances variées
- 17 souches de *L. innocua*
- 8 souches de *L. seeligeri*
- 9 souches de *L. welshimeri*
- 16 souches de *L. ivanovii*
- 3 souches de *L. grayi*
- 4 souches de *L. murrayi*
- 2 souches de *Brochothrix thermosphacta*
- 1 souche de *Brochothrix campestris*
- 1 souche de *Bacillus subtilis*
- 1 souche de *Bacillus cereus*
- 1 souche de *Bacillus megaterium*
- 3 souches de *Erysipelothrix rhusiopathiae*
- 1 souche de *Lactobacillus acidophilus*
- 2 souches de *Streptococcus* groupe A
- 1 souche de *Streptococcus* groupe B
- 1 souche de *Streptococcus* groupe C

- 1 souche de *Streptococcus faecalis*
- 1 souche de *Streptococcus suis*
- 1 souche de *Escherichia coli*

5 L'hybridation des ARN ribosomiques d'une bactérie-cible a été conduite selon le procédé de détection semi-automatisé décrit dans le brevet français n° 2.663.040. La sonde de détection est conjuguée à la phosphatase alcaline.

L'ARN ribosomique des souches a été extrait selon le protocole de base pour l'extraction de l'ARN des bactéries Gram + décrit dans "Current Protocols in Molecular
10 Biology" 1987, Ausubel FM et al., Wiley interscience, New York. Dans une plaque de microtitration (Nunc 439454) est déposée une solution de 1 ng/μl de l'oligonucléotide de capture, dont l'extrémité 5' est couplée avec le réactif Aminolink 2 (marque déposée, Applied Biosystems, Foster city, Californie) dans du PBS 3X (0.45 M NaCl ; 0.15 M phosphate de sodium ; pH 7.0). La plaque est incubée 2 h à 37° C puis lavée 3 fois avec 300 μl de PBST
15 (PBS 1x, Tween 20: 0,5 % (Merck 822184)). Le réactif Aminolink 2 permet d'ajouter à l'extrémité 5' de la sonde un bras comportant un groupement 6-aminohexyle. L'utilisation d'une sonde couplée à un ligand possédant un groupement polaire (amine primaire) fixée de façon passive sur le support, permet d'obtenir un signal amélioré (demande FR 2.679.255).

La cible (10 μl d'ARN totaux) mélangée avec 40 μl de tampon PBS saumon (PBS-
20 3X + ADN de sperme de saumon 10 μg/ml (Sigma D 9156) est déposée dans le puits en présence de 50 μl d'une solution du conjugué oligonucléotide-peroxydase, constituant la sonde de détection, à la concentration de 0.1 ng/μl en oligonucléotide dans un tampon PBS-cheval (PBS 3X + 10 % sérum de cheval (BioMérieux 55842)). La plaque est incubée 1 h à 37° C puis lavée par 3 fois avec 300 μl de tampon PBST. Dans chaque puits, on ajoute 100 μl de
25 substrat OPD (ortho-phénylènediamine Cambridge Medical Biotechnology ref/456) à la concentration de 4 mg/ml dans un tampon (0,055 M acide citrique, 0,1 M monohydrogénophosphate de sodium, pH 4,93), auquel on ajoute extemporanément du peroxyde d'hydrogène à 30% dilué au 1/1000. Après 20 min de réaction l'activité enzymatique est arrêtée par 100 μl d'acide sulfurique 1N et la lecture est effectuée à 492 nm sur un appareil
30 Axia Microreader (AXIA) (bioMérieux).

Les résultats des tests effectués ont montré que la combinaison de sondes utilisée est spécifique de *L. monocytogenes*.

L'adaptation de la combinaison spécifique de sondes testées sur l'automate VIDAS (BIO MERIEUX-VITEK) a été effectuée. La paroi du puits de microplaque est ici remplacée
5 par le SPR ("Solid Phase Receptacle") (BIOMERIEUX-VITEK-USA) qui est un support conique réalisé à partir d'un matériau appelé K résine (marque déposée pour un copolymère butadiène-styrène). Les divers réactifs sont déposés dans une barrette à plusieurs cuvettes et les différentes étapes se déroulent dans le SPR qui est capable d'aspirer et de refouler les réactifs. La réaction d'hybridation sandwich décrite dans le protocole ci-dessous se produit sur
10 la paroi interne du cône.

Dans un premier temps, l'oligonucléotide de capture comportant à son extrémité 5' le ligand Aminolink 2 (Applied Biosystems-réf.400808) est fixé passivement sur la surface interne du SPR, à une concentration de 1 ng/µl dans un volume de 315 µl d'une solution de PBS 4x (phosphate de sodium 200 mM pH 7,0, NaCl 600 mM). Après une nuit à température
15 ambiante ou deux heures à 37°C, les cônes sont lavés 2 fois par une solution PBS Tween, puis séchés sous vide

La barrette associée à l'automate VIDAS contient dans des cuvettes les réactifs nécessaires à la détection, c'est à dire:

- dans le premier puits de la barrette, 10 µl de l'ARN extrait dans le même tampon
20 que pour le protocole microplaque ci-dessus
- dans un second puits, 200 µl d'une solution à 0,1 ng/µl du conjugué de détection oligonucléotide-phosphatase alcaline,
- dans un troisième et un quatrième puits, 600 µl de solution de lavage PBS Tween
- et enfin une cuvette avec 250 µl de substrat MUP (méthyl-4 umbelliféryl
25 phosphate) en solution dans un tampon diéthanolamine.

Les contenus du premier et du second puits sont aspirés dans le cône prétraité comme indiqué précédemment. Après incubation 30 minutes, le cône est lavé 2 fois par une solution de PBS Tween et 250 µl de substrat MUP (méthyl-4 umbelliféryl phosphate) sont aspirés puis relâchés dans une cuvette de lecture. L'appareil mesure le signal fluorescent
30 exprimé en URF (unités relatives de fluorescence) de la cuvette.

Les résultats obtenus avec ce système sont identiques à ceux obtenus en plaque de microtitration.

EXEMPLE 3 :

De façon analogue, on peut détecter la présence de *L. innocua* à l'aide de la combinaison des deux sondes suivantes pour la capture et la détection, respectivement :

5 1ère sonde : GGGTTAGAAT GGTCATACAG CCAGGGT
 2ème sonde : CCACGCGCTT AGCGTGG

EXEMPLE 4 :

10 De façon analogue, on peut détecter la présence de *L. ivanovii* à l'aide de la combinaison des deux sondes suivantes pour la capture et la détection, respectivement :

 1ère sonde : TTCATCCACA GTTTCGGTAA TATGT
 2ème sonde : CGAACCTCTA TAAGAGGTTC A

Annexe 1/3

GGAGCCGT*AGCGAA*GCGAGTCTGAATAGGGCG*CATTAAGTAACAGGTCGTAGACCCGAAACCA*GG	L.monocyt ATCC 19115
-----	L.monocyt ATCC 15313
-----	L.monocyt D 011

-----	L.monocyt 83 09 022
-----	L.seelige CCUG 15330

-----	L.seelige 88 05 029
-----	L.seelige 88 06 080
-----	L.innocua ATCC 33090
-----	L.innocua 83 09 044
-----	L.innocua 83 09 005

-----	L.welshim CCUG 15529
-----	L.grayi A ATCC 19120
-----	L.murrayi CCUG 4984
-----	B.campest ATCC 43754
-----	B.thermos ATCC 11509
-----	E.coli

BNSDOCID: <WC___9624686A2_I>

Annexe 3/3

ACCC	TGG	CTGT	*ATG	ACCA	TTCT	TAAC	CCG	CCAC	CGCT	TAG	CGCG	TGG	GAG	ACAG	TGTC	AGGT	GGC	*AG	L.monocyt	ATCC	19115
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.monocyt	ATCC	15313
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.monocyt	D 011	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.monocyt	83 09	030
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.monocyt	83 09	022
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.seelige	CCUG	15330
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.seelige	88 05	028
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.seelige	88 05	029
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.seelige	88 06	080
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.innocua	ATCC	33090
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.innocua	83 09	044
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.innocua	83 09	005
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.innocua	83 09	014
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.ivanovi	CIP	7842
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.welshim	CCUG	15529
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.grayi	A	ATCC 19120
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L.murrayi	CCUG	4984
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	B.campest	ATCC	43754
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	B.thermos	ATCC	11509
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	E.coli		

REVENDICATIONS

1. Oligonucléotide monocaténaire, caractérisé par le fait qu'il est choisi parmi les oligonucléotides, ayant au moins 12 motifs nucléotidiques, dont la séquence est incluse dans l'une des séquences (a₁) à (a₁₀) de la liste suivante :

- 5 (a₁) GGAGCCGTAG CGAAAGCGAG TCTGAATAGG GCGCATAAGT AACAGGTCGT
AGACCCGAAA CCAGG
- (a₂) GGAGCCGTAG CGAAAGCGAG TCTGAATAGG GCGAATAAGT AACAGGTCGT
AGACCCGAAA CCAGG
- 10 (a₃) GGAGCCGTAG CGAAAGCGAG TCTGAATAGG GCGTATGAAG TAACAGGTCG
TAGACCCGAA ACCAGG
- (a₄) CCGAAACTGT GGATGAACCT CTTTAGAGGT TCGTGGTAGG AGAGCGTTCT
AAGG
- (a₅) AAACATATTA CCGAAACTGT GGATGAACCT CTTCCGAGGT TCGTGGTAGG
15 AGAGCGTTCT AAGG
- (a₆) AAACATATTA CCGAAACTGT GGATGAACCT CTTATAGAGG TTCGTGGTAG
GAGAGCGTTC TAAGG
- (a₇) AAACGTATTA CCGAAACTGT GGATGAACAT CTTCCGATGT TCGTGGTAGG
AGAGCGTTCT AAGG
- 20 (a₈) ACCCTGGCTG TATGACCATT CTAACCCGCC ACGCTTAGCG CGTGGGGAGA
CAGTGTCAGG TGGGCAG
- (a₉) ACCCTGGCTG TATGACCATT CTAACCCACC ACGCTTAGCG CGTGGGGAGA
CAGTGTCAGG TGGGCAG
- (a₁₀) ACCCTGGCTG TATGACCATT CTAACCCGCC ACGCTAAGCG CGTGGGGAGA
25 CAGTGTCAGG TGGGCAG ;

ainsi qu'un oligonucléotide complémentaire dudit oligonucléotide.

2. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il comporte une séquence d'au moins cinq motifs nucléotidiques consécutifs incluse dans une séquence comprise à l'intérieur des crochets figurant dans les séquences (b₁) à (b₄) de la liste suivante :

- 30 (b₁) AGTCTGAATA GG[GCGCATA]A GTAACAGGTC GTAGA
- (b₂) AGTCTGAATA GG[GCGAATA]A GTAACAGGTC GTAGA
- (b₃) AGTCTGAATA GG[GCGTATGA AG]TAACAGGT CGTAGA
- (b₄) CCGAAACTGT GGATGAACCT [CTTTAGAG]GT TCGTGGTAGG

(b₅) CCGAAACTGT GGATGAACCT [CTTCGGAG]GT TCGTGGTAGG
 (b₆) CCGAAACTGT GGATGAACCT [CTTATAG]AGG TTCGTGGTAG G
 (b₇) CCGAAACTGT GGATGAACAT CTT[CGGATGT T]CGTGGTAGG
 (b₈) A[AACGTAT]TA CCGAAACTGT GGATGAA
 5 (b₉) CCGAAACTGT GGATG[AACAT CT]TCGGATGT TCGTGGTAGG
 (b₁₀) TGGCTGTATG ACCATTCTAA [CCCGCCA]CGC T
 (b₁₁) CCAC[GCTTAG C]GCGTGGGGA GACAGTGTCA GG
 (b₁₂) TGGCTGTATG ACCATTCTAA [CCCACCA]CGC TTAGCGCGTG
 GGGAGACAGT GTCAGG
 10 (b₁₃) TGGCTGTATG ACCATTCTAA CCCGCCAC[GC TAAGC]GCGTG
 GGGAGACAGT GTCAGG
 (b₁₄) [CCGCCA]CGCT TAGCGCGTGG GGAGACAGTG TCAGGTGGGC AG
 (b₁₅) TGGCTGTATG ACCATTCTAA CCCGCCAC[GC TTAG] ;

ainsi qu'un oligonucléotide complémentaire dudit oligonucléotide.

15 3. Oligonucléotide selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que sa séquence est incluse dans l'une des séquences (c₁) à (c₁₄) suivantes :

(c₁) GAATAGGGCG CATAAGTAAC A
 (c₂) GAATAGGGCG AATAAGTAAC A
 (c₃) ATAGGGCGTA TGAAGTAACA
 20 (c₄) TGAACCTCTT TAGAGGTTCG TG
 (c₅) TGAACCTCTT CGGAGGTTCG TG
 (c₆) TGAACCTCTT ATAGAGGTTC G
 (c₇) GTGGATGAAC ATCTTCGGAT GTTCGTGGTA
 (c₈) AAACGTATTA CCGAA
 25 (c₉) ATTCTAACCC GCCACGCT
 (c₁₀) ATTCTAACCC ACCACGCTTA G
 (c₁₁) CCACGCTTAG CGCGTGG G
 (c₁₂) CCGCCACGCT AAGCGCGTGG G
 (c₁₃) CCGCCACGCT TAGCGCGTGG G
 30 (c₁₄) TTCTAACCCG CCACGCTTAG ;

ainsi qu'un oligonucléotide complémentaire dudit nucléotide.

4. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé par le fait que sa séquence est incluse dans l'une des séquences (d₁) à (d₆) suivantes :

(d₁) AAGTAACAGG TCGTAGAC

(d₂) TATTACCGAA ACTGTGGATG AAC

5 (d₃) ACCCTGGCTG TATGACCATT CTAACCC

(d₄) AGCGCGTGGG GAGACAGT

(d₅) CAGTGTCAGG TGGGCAG

(d₆) GTTCGTGGTA GGAGAGCGTT ;

ainsi qu'un oligonucléotide complémentaire dudit oligonucléotide.

10 5. Oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est immobilisé sur un support solide.

6. Oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait qu'il est marqué avec un agent traceur.

15 7. Procédé de détermination de la présence ou de l'absence d'au moins une bactérie du genre *Listeria*, dans un échantillon contenant ou susceptible de contenir des acides nucléiques d'au moins une telle bactérie, selon une méthode dans laquelle on met en contact ledit échantillon avec au moins une sonde nucléique, puis on détermine de façon connue en soi la formation ou l'absence de formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon, caractérisé par le fait que ladite sonde est un oligonucléotide choisi
20 parmi ceux qui sont définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8. Procédé selon la revendication 7, pour la détermination de la présence ou l'absence d'une espèce ou d'un groupe d'espèces de bactéries du genre *Listeria*, caractérisé par le fait que l'on utilise comme sondes nucléiques d'une part une première sonde telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 4 et d'autre part une seconde sonde telle que définie dans la
25 revendication 2 ou 3, étant entendu que lesdites première et seconde sondes sont capables de s'hybrider avec des régions non chevauchantes de l'ARNr 23S (ou son complémentaire) d'une bactérie du genre *Listeria*.

9. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que l'on utilise ladite première sonde est telle que définie dans la revendication 5 et ladite deuxième sonde est
30 telle que définie dans la revendication 6.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, pour la détermination de la présence d'au moins une bactérie quelconque du genre *Listeria*, ou de l'absence d'une telle

bactérie, caractérisé par le fait que l'on utilise comme sonde un oligonucléotide tel que défini dans la revendication 4.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, pour la détermination de la présence ou de l'absence de *Listeria seeligeri*, caractérisé par le fait que l'on utilise une sonde telle que définie dans la revendication 2, incluse dans la séquence (b₂) ou (b₁₂), ou telle que définie dans la revendication 3, incluse dans la séquence (c₂) ou (c₁₀).

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, pour la détermination de la présence ou de l'absence de *Listeria innocua*, caractérisé par le fait que l'on utilise une sonde telle que définie dans la revendication 2, incluse dans la séquence (b₁₃), ou telle que définie dans la revendication 3, incluse dans la séquence (c₁₂).

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, pour la détermination de la présence ou de l'absence de *Listeria ivanovii*, caractérisé par le fait que l'on utilise une sonde telle que définie dans la revendication 2, incluse dans la séquence (b₆), ou telle que définie dans la revendication 3, incluse dans la séquence (c₆).

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, pour la détermination de la présence ou de l'absence de *Listeria grayi* et/ou *Listeria murrayi*, caractérisé par le fait que l'on utilise une sonde telle que définie dans la revendication 2, incluse dans la séquence (b₃), (b₇), (b₈) ou (b₉), ou telle que définie dans la revendication 3, incluse dans la séquence (c₃), (c₇) ou (c₈).

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé par le fait que l'on utilise ladite sonde en combinaison avec une sonde telle que définie dans la revendication 4.

16. Procédé selon revendication 8, pour la détermination de la présence ou de l'absence de *Listeria monocytogenes*, caractérisé par le fait :

- que l'une des sondes est telle que définie dans la revendication 2, incluse dans la séquence (b₁), (b₁₀), (b₁₄) ou (b₁₅), et l'autre sonde est telle que définie dans la revendication 2, incluse dans la séquence (b₄),

- ou que l'une des sondes est telle que définie dans la revendication 3, incluse dans la séquence (c₁), (c₉), (c₁₃) ou (c₁₄), et l'autre sonde est telle que définie dans la revendication 3,

incluse dans la séquence (c₄)

17. Utilisation comme amorce nucléotidique pour la synthèse d'un acide nucléique en présence d'une polymérase, d'un oligonucléotide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 4.

18. Sonde de thérapie, caractérisée par le fait qu'elle comprend un oligonucléotide tel
5 que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 4.

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/68, C07H 21/04	A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/24686 (43) Date de publication internationale: 15 août 1996 (15.08.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00202 (22) Date de dépôt international: 7 février 1996 (07.02.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/01431 8 février 1995 (08.02.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy l'Etoile (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MABILAT, Claude [FR/FR]; 408, chemin Pierre-Drevet, F-69140 Rilleux-la- Pape (FR). SALLEN, Brunehild [FR/FR]; 14, rue Jacques- Monod, F-69007 Lyon (FR). (74) Mandataire: TONNELIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification</i> <i>des revendications, sera republiée si de telles</i> <i>modifications sont reçues.</i> (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 26 septembre 1996 (26.09.96)
(54) Title: DETECTION OF BACTERIA OF GENUS LISTERIA USING NUCLEIC PROBE HYBRIDISATION TECHNIQUES (54) Titre: DETECTION DE BACTERIES DU GENRE LISTERIA SELON DES TECHNIQUES D'HYBRIDATION DE SONDAS NUCLEIQUES (57) Abstract <p>Single-stranded oligonucleotides capable of hybridising with the ribosomal RNA 23S of bacteria of genus <i>Listeria</i>, or with one of the strands of the corresponding DNA, are disclosed. The oligonucleotides are particularly useful as probes specific for genus <i>Listeria</i>, or for a species or group of species thereof, as applicable, in detection methods using nucleic probe hybridisation techniques.</p> (57) Abrégé <p>Oligonucléotides monocaténares capables de s'hybrider avec l'ARN ribosomique 23S de bactéries du genre <i>Listeria</i>, ou avec l'un des brins de l'ADN correspondant. Ces oligonucléotides sont utilisables notamment comme sondes spécifiques, selon les cas, du genre <i>Listeria</i>, ou d'une espèce ou d'un groupe d'espèces dudit genre, dans des méthodes de détection utilisant les techniques d'hybridation de sondes nucléiques.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/FR 96/00202

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68 C07H21/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 501 356 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 2 September 1992 see the probe C, fig. 4. ---	1,5,6
X	WO,A,93 04201 (AMOCO CORP.) 4 March 1993 * See SEQ ID NO 122, page 19* ---	1-3,5,6
X	EP,A,0 480 289 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 15 April 1992 see page 4; example 1 ---	1,5,6
X	WO,A,93 11257 (BOEHRINGER INGLEHEIM INTERNATIONAL GMBH) 10 June 1993 * See page 53, SEQ ID NO 31* ---	1,2,5,6
Y	WO,A,95 03412 (BIOMERIEUX) 2 February 1995 see page 1 - page 7, line 22 ---	1-18
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 July 1996

Date of mailing of the international search report

31.07.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
/FR 96/00202

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 96, September 1992, pages 219-224, XP002008632 THOMPSON, D ET AL : "studies on the ribosomal RNA operons of Listeria monocytogenes" see the whole document ---	1-18
Y	SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 15, 1992, pages 487-501, XP002008633 LUDWIG, W ET AL: "complete 23S Ribosomal RNA sequences of gram positive bacteria with a low DNA G+C content" see the whole document ---	1-18
Y	WO,A,90 08841 (GENE-TRAK SYSTEMS) 9 August 1990 see the whole document ---	1-18
Y	EP,A,0 314 294 (GENE-TRAK SYSTEMS) 3 May 1989 see the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/00202

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-501356	02-09-92	DE-A- 4106251	03-09-92
		AU-B- 641085	09-09-93
		AU-B- 1113992	17-09-92
		CA-A- 2062078	29-08-92
		JP-A- 5076400	30-03-93
		JP-B- 6055159	27-07-94
		NZ-A- 241697	25-11-94
WO-A-9304201	04-03-93	US-A- 5521300	28-05-96
		EP-A- 0552358	28-07-93
		JP-T- 6502312	17-03-94
EP-A-480289	15-04-92	DE-A- 4038804	16-04-92
		AT-T- 122104	15-05-95
		AU-B- 655781	12-01-95
		AU-B- 8627591	28-04-92
		CA-A- 2052668	10-04-92
		CA-A- 2093647	10-04-92
		DE-D- 59105402	08-06-95
		WO-A- 9206216	16-04-92
		EP-A- 0552203	28-07-93
		ES-T- 2073771	16-08-95
		IL-A- 99663	31-12-95
		JP-A- 4258299	14-09-92
		JP-B- 6040839	01-06-94
		JP-T- 6501157	10-02-94
WO-A-9311257	10-06-93	DE-A- 4138621	17-06-93
		AU-B- 668118	26-04-96
		AU-B- 2945592	28-06-93
		CA-A- 2122356	10-06-93
		EP-A- 0621901	02-11-94
		JP-T- 7505046	08-06-95
WO-A-9503412	02-02-95	FR-A- 2709310	03-03-95
		CA-A- 2145172	02-02-95
		EP-A- 0662131	12-07-95
WO-A-9008841	09-08-90	AU-B- 5188190	24-08-90
		CA-A- 2025236	07-08-90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

DD / FR 96/00202

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9008841		EP-A- 0418346	27-03-91
		JP-T- 3504677	17-10-91
		US-A- 5376528	27-12-94

EP-A-314294	03-05-89	US-A- 5089386	18-02-92
		AT-T- 110419	15-09-94
		AU-B- 2213488	16-03-89
		DE-D- 3851200	29-09-94
		DE-T- 3851200	23-03-95
		JP-A- 1304899	08-12-89

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No
PCT/FR 96/00202

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12Q1/68 C07H21/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP,A,0 501 356 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 2 Septembre 1992 voir la sonde C, fig. 4. ---	1,5,6
X	WO,A,93 04201 (AMOCO CORP.) 4 Mars 1993 * voir SEQ ID NO 122, page 19* ---	1-3,5,6
X	EP,A,0 480 289 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 15 Avril 1992 voir page 4; exemple 1 ---	1,5,6
X	WO,A,93 11257 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 10 Juin 1993 * voir page 53, SEQ ID NO 31* ---	1,2,5,6
Y	WO,A,95 03412 (BIOMERIEUX) 2 Février 1995 voir page 1 - page 7, ligne 22 ---	1-18
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 Juillet 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31.07.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Osborne, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. ^{te} Internationale No

P₁/FR 96/00202

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 96, Septembre 1992, pages 219-224, XP002008632 THOMPSON, D ET AL : "studies on the ribosomal RNA operons of Listeria monocytogenes" voir le document en entier ---	1-18
Y	SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 15, 1992, pages 487-501, XP002008633 LUDWIG, W ET AL: "complete 23S Ribosomal RNA sequences of gram positive bacteria with a low DNA G+C content" voir le document en entier ---	1-18
Y	WO,A,90 08841 (GENE-TRAK SYSTEMS) 9 Août 1990 voir le document en entier ---	1-18
Y	EP,A,0 314 294 (GENE-TRAK SYSTEMS) 3 Mai 1989 voir le document en entier -----	1-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 96/00202

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
EP-A-501356	02-09-92	DE-A-	4106251	03-09-92
		AU-B-	641085	09-09-93
		AU-B-	1113992	17-09-92
		CA-A-	2062078	29-08-92
		JP-A-	5076400	30-03-93
		JP-B-	6055159	27-07-94
		NZ-A-	241697	25-11-94

WO-A-9304201	04-03-93	US-A-	5521300	28-05-96
		EP-A-	0552358	28-07-93
		JP-T-	6502312	17-03-94

EP-A-480289	15-04-92	DE-A-	4038804	16-04-92
		AT-T-	122104	15-05-95
		AU-B-	655781	12-01-95
		AU-B-	8627591	28-04-92
		CA-A-	2052668	10-04-92
		CA-A-	2093647	10-04-92
		DE-D-	59105402	08-06-95
		WO-A-	9206216	16-04-92
		EP-A-	0552203	28-07-93
		ES-T-	2073771	16-08-95
		IL-A-	99663	31-12-95
		JP-A-	4258299	14-09-92
		JP-B-	6040839	01-06-94
		JP-T-	6501157	10-02-94

WO-A-9311257	10-06-93	DE-A-	4138621	17-06-93
		AU-B-	668118	26-04-96
		AU-B-	2945592	28-06-93
		CA-A-	2122356	10-06-93
		EP-A-	0621901	02-11-94
		JP-T-	7505046	08-06-95

WO-A-9503412	02-02-95	FR-A-	2709310	03-03-95
		CA-A-	2145172	02-02-95
		EP-A-	0662131	12-07-95

WO-A-9008841	09-08-90	AU-B-	5188190	24-08-90
		CA-A-	2025236	07-08-90

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à : [redacted] des familles de brevets

Recherche Internationale No
FR 96/00202

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9008841		EP-A- 0418346	27-03-91
		JP-T- 3504677	17-10-91
		US-A- 5376528	27-12-94

EP-A-314294	03-05-89	US-A- 5089386	18-02-92
		AT-T- 110419	15-09-94
		AU-B- 2213488	16-03-89
		DE-D- 3851200	29-09-94
		DE-T- 3851200	23-03-95
		JP-A- 1304899	08-12-89

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)